

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Philipps-Universität zu Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. F. Schleyer

Untersuchungen über die Blutartunterscheidung in Blutspuren an Hand des Esterasemusters

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ernst R. Raabe
aus Gießen

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin
der Philipps-Universität zu Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. F. Schleyer

Untersuchungen über die Blutartunterscheidung in Blutspuren an Hand des Esterasemusters



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ernst R. Raabe

aus Gießen

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 17.5.1967

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. u. Dr. med. dent. H. Meuser

Referent: Prof. Dr. F. Schleyer

Korreferent: Prof. Dr. G. G. Wendt

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

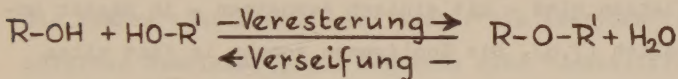
I n h a l t

	Seite
A. <u>Einleitung</u> : Die Esterasen	1
1. Die Lipasen und Ali-Esterasen	1
2. Die Cholinesterasen	3
3. Esterasen in Tier- und Menschenblut	4
B. <u>Eigene Untersuchungen</u>	
1. Prinzip	9
2. Material	9
3. Technik	10
4. Ergebnisse	12
5. Fehlerquellen	17
C. <u>Besprechung</u>	19
D. <u>Zusammenfassung</u>	30
E. <u>Literatur</u>	31

A. Einleitung

Die Esterasen

Die Esterasen gehören der Gruppe der "Hydrolasen" an. Es sind Enzyme, welche die Hydrolyse und/oder Synthese von Esterbindungen, also Verbindungen zwischen Hydroxyl- und Säuregruppen, katalytisch beschleunigen:



Alkohol + Säure

Ester + Wasser

Nach dem Substrat (R') werden die Esterasen in solche eingeteilt, die organische Ester synthetisieren oder verseifen, und solche, die anorganische Ester bilden oder spalten. In diesem Zusammenhang sind jedoch nur die erstgenannten von Interesse, und auch nur ein Teil von ihnen soll hier besonders erwähnt werden.

1. Die Lipasen und Ali-Esterasen

Im gesamten Tier- und Pflanzenreich findet man Enzyme, die die Spaltung, Umesterung und Synthese von Karbonsäureestern bewirken. Am bedeutsamsten sind diejenigen, die den hydrolytischen Stoffwechsel der Fette,

also der Glyzerinester, beherrschen. Sie sind zuerst als eigentliche Lipasen angesprochen worden. Sie umfassen jedoch auch Enzyme, welche die Karbonsäureester einwertiger Alkohole, z. B. Methylbutyrat, zu spalten vermögen. Für diese Fermente verwendet man auch den Ausdruck Ali-Esterasen. Die Lipasen werden in Zoolipasen und Phytolipasen eingeteilt, sowohl aus Gründen des verschiedenen Vorkommens, als auch wegen verschiedener Eigenschaften. Die Lipasen der höheren Pflanzen sind - mit einigen Ausnahmen - in Wasser unlöslich (7,8). Die Zoolipasen kommen in fast allen Organen und in den Körperflüssigkeiten (Blut, Liquor, Milch, Harn) vor. Im Blut enthalten sowohl Serum, als auch Blutkörperchen Lipasen (7). Man unterscheidet zwischen Pankreas- und Organlipasen (1,8). Die Pankreaslipase (Sekretionsenzym) vermag Fette schneller zu spalten als andere Ester (1,7,8). Dabei wird die mittlere Esterbindung der Triglyzeride am langsamsten hydrolysiert (8). Die bessere Spaltbarkeit der Glyzeride ungesättigter Fettsäuren erklärt sich aus dem niedrigen Schmelzpunkt (8). Der Pankreaslipase stehen die Lipasen von Magen und Fettgewebe nahe (7). Die Organlipasen, vom Typ der Leberesterase, können in fast allen Organen nachgewiesen werden. Besonders reich an Esterasen dieses Typs sind Leber, Niere, Placenta und das Blut (1,8). Im Gegensatz zur Pankreaslipase werden die Fette langsamer gespalten als

die Ester einwertiger Alkohole (verschiedenes Apoferment, 1,7,8). Im Blut scheinen beide Typen von Lipasen vorhanden zu sein (13). Bei AUGUSTINSSON werden die Lipasen des Blutserums als B-Esterasen bezeichnet (s. U.).

2. Die Cholinesterasen

Man unterscheidet zwei Enzyme dieses Typs. Erstens die "wahre" Cholinesterase, besser als Azetylcholinesterase bezeichnet, und zweitens eine "unspezifische" Cholinesterase (auch als Pseudocholinesterase bezeichnet (1,8,15)). Die erstgenannte findet sich in allen Arten von Nervenzellen bei Wirbeltieren und bei Wirbellosen, in motorischen und sensiblen Fasern, in parasympathischen und sympathischen, in zentralen und peripheren Nerven, sowie im Gehirn (3). Im Blut wird sie in den Erythrozyten gefunden (1,8,13,19). Nach ZAJICEK^V und DASSA soll sie bei verschiedenen Tierarten auch in den Thrombozyten vorhanden sein. Obwohl die Azetylcholinesterase als sehr spezifisches Enzym angesehen wurde, konnte durch WHITTAKER gezeigt werden, daß sie auch Phenylazetat zu hydrolysieren vermag. Die unspezifische Cholinesterase, die außer Cholinestern auch andere Ester angreift, konnte im Pankreas, in der Leber (Bildungsort) und im Blutplasma nachgewiesen werden (1,8,13,19). Der Serumspiegel dieses Fermentes ist sehr

gering bei Wiederkäuern, Vögeln und Fischen, bei Pferden dagegen sehr hoch (1,3,7,15). AMMON fand hohe Aktivität der Cholinesterase in Menschen-, Pferde- und Hunde-, geringe dagegen in Kaninchen- und Rinder Serum. Nach GUNTER scheint die Butyrylcholinesterase im gesamten Körpergewebe der Wiederkäuer nicht aufzutreten. Bei ihnen ist nur die Azetylcholinesterase anzutreffen, und zwar auch im Serum. GOEDDE und FUSS stellten, geordnet nach der Pseudocholinesteraseaktivität verschiedener Tierarten, folgende Reihe auf: Mensch, Rhesusaffe, Pferd, Hund, Katze. Bei Ratte, Schwein, Hammel, Rind und Kaninchen ließ sich praktisch keine Aktivität messen. Die Ergebnisse wurden spektrophotometrisch (Substrat: Benzoylcholin) und im Agar-Diffusionstest (Substrat α - Naphthylbutyrat) ermittelt. Mit geringen Abweichungen gibt AUGUSTINSSON eine ähnliche Reihenfolge an (6). Bei HOFFMANN-OSTENHOF wird die Azetylcholinesterase als Cholinesterase I und die unspezifische Cholinesterase als Cholinesterase II bezeichnet.

3. Esterasen in Tier- und Menschenblut

Nach AMMON stellt das esterasespaltende Ferment des Blutes die Summe der Organesterasen dar; eine Blutesterase sui generis wird nicht angenommen. Bei den Blutkörperchen ist der Gehalt an Lipasen in den Leukozyten, besonders den eosinophilen Granulozyten und den Lympho-

zyten bekannt (19). Monozyten und neutrophile Granulozyten zeigen nur schwache Esterasereaktionen (11). HARDIN und Mitarbeiter konnten in den Erythrozyten keine Lipasen nachweisen. AMMON und JAARMA erwähnen jedoch, daß in den Erythrozyten esterspaltende Fermente nachgewiesen werden konnten.

Von mehreren Autoren wurden Untersuchungen über den Gehalt esterspaltender Fermente im Serum beschrieben. ALDRIDGE führte eine Nomenklatur für Serumesterasen ein, die p-Nitrophenylazetat, -propionat und -butyrat hydrolysieren. Er unterscheidet zwischen A- und B-Esterasen. Die A-Esterasen, die p-Nitrophenylazetat besser spalten als -butyrat, werden durch E 600 blockiert, während die B-Esterasen nicht gehemmt werden. AUGUSTINSSON fügte diesen noch die Bezeichnung C-Esterasen hinzu und beschrieb außer der Substratspezifität und der Hemmbarkeit noch das Verhalten der Esterasen bei der Elektrophorese. Die Ergebnisse zeigten, daß das Plasma verschiedener Tierarten alle drei, nur zwei oder eine der drei Esterasearten enthält. Die drei Arten wurden, was die Substratspezifität und die elektrophoretische Wanderung betrifft, wie folgt charakterisiert:

A-Esterasen (Arylesterasen): Sie stellen typische aromatische Esterasen dar, die Phenylazetat in höherem Maße spalten als Phenylbutyrat. Aliphatische Ester werden normalerweise nicht angegriffen. Die A-Esterasen zeigen bei der Elektrophorese die schnellste Wanderung.

Sie bewegen sich zusammen mit oder nahe den Albuminen.

B-Esterasen (aliphatische Esterasen, Lipasen): Sie spalten sowohl aliphatische, als auch aromatische Ester. Es wird unterschieden in Azetyl-, Propionyl- und Butyryl-B-Esterasen. Cholinester werden nicht angegriffen. Die B-Esterasen bewegen sich bei der Elektrophorese langsamer als die A-Esterasen und schneller als die C-Esterasen. Sie finden sich elektrophoretisch bei oder nahe der α_1 -Globulinfraktion.

C-Esterasen (Cholinesterasen): Von ihnen werden die Cholinester am besten gespalten. Aromatische und aliphatische Ester werden wenig oder gar nicht hydrolysiert (aliphatische besser als aromatische). Ihre elektrophoretische Wanderung ist von allen drei Arten die geringste (außer Froschserum), sie werden zwischen den Fraktionen der α_2 - und der β -Globuline gefunden. Auf die Verteilung der drei Esterasearten bei den verschiedenen Tierseren wird bei der Besprechung der eigenen Ergebnisse unten eingegangen.

HARRIS und Mitarbeiter konnten durch zweidimensionale Elektrophorese bei Kombination von Papier- und Stärkegelelektrophorese nach POULIK und SMITHIES vier Fraktionen der Cholinesterasen im menschlichen Serum nachweisen. Sie wurden als C_1 , C_2 , C_3 und C_4 bezeichnet und konnten bei allen Untersuchungen gefunden werden. Weiterhin wurden folgende Unterschiede innerhalb der Gruppe der Cholinesterasen aufgezeigt: bei Lager-

ung des Serums konnten nach etwa 10 Tagen eine S_1 - und nach einigen Wochen oder Monaten eine S_2 -Fraktion nachgewiesen werden (S = storage). In Neugeborenen- und Fetalserum wurde eine f-Fraktion gefunden, deutlich abgegrenzt von C_4 , die auch öfters in Erwachsenenserum vorhanden war. Ferner wird über eine C_5 -Fraktion und deren Erbgang berichtet.

LAWRENCE und Mitarbeiter haben mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese Proteine und Enzyme verschiedener Tierarten untersucht. Als Substrat wurde α -Naphthylazetat für den Esterasenachweis verwandt. Nach der hydrolytischen Spaltung wurde mit Echtblausalz B gefärbt. Die verschiedenen Seren lassen sich durch charakteristische Banden differenzieren, welche sich in Zahl, Breite und Entfernung vom Startpunkt unterscheiden.

SAMICO und Mitarbeiter haben dann die Esterasen in Trockenbluten von 12 verschiedenen Tierarten, ebenfalls in der Stärkegelelektrophorese, untersucht. Das Vollblut wurde auf Leinenstückchen getrocknet. Die trockenen Proben wurden in Briefumschlägen bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Zur Untersuchung wurde das Blut in verschiedenen Zeitabständen mit destilliertem Wasser ausgezogen. Als Substrat wurde α -Naphthylazetat und -butyrat benutzt, angefärbt wurde mit Echtblausalz RR. Auf die ermittelten Banden wird unten näher eingegangen. Es konnte durch diese Versuche gezeigt werden, daß die

Aktivität der Esterasen stetig abfällt, bis nach 210 Tagen keine Reaktionen mehr wahrzunehmen waren. Bei der Extraktion des getrockneten Menschenblutes bei 37° C für 24 Stunden konnten die Autoren noch Reaktionen nach 310 Tagen erhalten.

B. Eigene Untersuchungen

1. Prinzip

Durch die Elektrophorese werden die verschiedenen Proteinkörper des Blutes, auch die hier untersuchten Esterasen, im Stärkegel voneinander getrennt. Nach der Elektrophorese wird das Substrat α -Naphthylbutyrat zur Spaltung zugegeben, unter Berücksichtigung des pH-Optimums des Fermentes. Das freigesetzte α -Naphthol markiert nach Kupplung mit dem später zugesetzten Echtblausalz RR oder Echtblausalz B durch charakteristische Banden den Sitz der Esterasen.

2. Material

Untersucht wurden Menschen- und Tierblutproben. Das Blut wurde ohne gerinnungshemmende Zusätze in offenen Petrischalen bei Zimmertemperatur getrocknet. Die trockenen Blutschüppchen und -krusten wurden dann entweder in verschlossenen Reagenzgläsern im Kühlschrank aufbewahrt oder in den offenen Petrischalen frei im Laboratorium belassen, im ersten Fall bis zu 8 Monaten, im zweiten bis zu 4 Monaten. In einer weiteren Versuchsserie wurde menschliches Zitratblut bis herab zu Mengen von 0,005 ml auf Leinenstreifen pipettiert, bei Zimmertemperatur getrocknet und für

4 Monate frei im Raume belassen. Zur Untersuchung wurde das Trockenblut jeweils 30 Minuten vor Beginn der Elektrophorese in destilliertem Wasser gelöst.

3. Technik

Die Methode zur Durchführung der Stärkegelelektrophorese wurde den Arbeiten von SMITHIES, LAWRENCE und Mitarbeitern sowie SAMICO und Mitarbeitern entnommen. Das Gel wurde aus Haptoglobinstärke-"Biotest" (Handelsname) in Boratpuffer zubereitet.

Gelpuffer (pH 8,4):

A: 2,7 g H_3BO_3 auf 1000 ml aqua dest.

B: 15 ml 2 n NaOH auf 1000 ml aqua dest.

Mischungsverhältnis: 100 ml A + 32,5 ml B

Für die benutzte Elektrophoresekammer wurden 300 ml Gelpuffer und etwa 36 g Stärke (je nach Charge wechselnd) benötigt. Zweidrittel der Pufferlösung wurde zum Sieden gebracht, in dem restlichen Drittel wurde die Stärke kalt gelöst, dann in den siedenden Puffer gegossen und unter Rühren kurz aufgekocht. Das gekochte Gel wurde dann auf einer Glasplatte in die Wanne ausgegossen. Etwa entstehende Luftblasen können vor dem Erkalten mit einer Nadel beseitigt werden. Nach einer Abkühlungszeit von 1 Stunde bei Zimmertemperatur und 30 min. im Kühlschrank wurde der Block beimpft. Es ist darauf zu achten, daß der Stär-

keblock immer gleich abgekühlt wird, damit die elektrophoretische Wanderung nicht durch einen verschiedenen Austrocknungsgrad von Untersuchung zu Untersuchung verändert wird.

Zum Aufbringen der Proben wurden mit einem Skalpell etwa 1 cm lange Schlitze in den Stärkeblock, parallel zur Breitseite, geschnitten. In die Schlitze wurden 0,5 x 1,5 cm große Filterpapierstückchen hochkant implantiert. Diese Filterpapierstückchen wurden vorher mit der wässrigen Lösung des Trockenblutes getränkt. Hierbei ist zu vermeiden, daß die Blutlösung, wenn die Papierstreifen zu stark getränkt wurden, unter dem Stärkeblock auf der Glasplatte entlangfließt, sich an einem der nächstgelegenen Streifen in die Höhe saugt und so etwa eine andere Probe verunreinigt. Die Gußbank mit dem beimpften Stärkeblock wurde dann in die Elektrophoresekammer eingesetzt, wo sie wie eine Brücke über zwei kleinen Wannen mit Pufferlösung liegt, in welche die Elektroden einmünden, und dort beiderseits mit einem Schwamm eingetaucht.

Brückenpuffer:

A: 28 g H_3BO_3 auf 2000 ml aqua dest.

B: 45 ml 2 n NaOH auf 1000 ml aqua dest.

Beide Lösungen mischen.

Abbildung 1 zeigt eine Skizze der verwendeten Apparatur (Modifikation der bei SMITHIES beschriebenen Apparatur).

Zur Elektrophorese wurde ein Strom von 25 - 30 mA angeschlossen, der Spannungsabfall im Stärkeblock betrug 5 V/cm. Nach 25 - 30 Minuten wurden die Filterpapierstreifen entfernt. Die Gesamttrennzeit betrug 3 Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde der Stärkeblock aus der Form genommen und mittels eines feinen Drahtes, der in einen Laubsägebügel eingespannt war, horizontal halbiert. Beide Hälften wurden auf Glasplatten ausgelegt und mit 3 ml Substratlösung (1% α -Naphthylbutyrat in 50% Aceton) in 40 ml 0,2 m Phosphatpuffer (pH 6) getränkt.

Phosphatpuffer:

A: 27,2 g KH_2PO_4 auf 1000 ml aqua dest.

B: 35,6 g Na_2HPO_4 auf 1000 ml aqua dest.

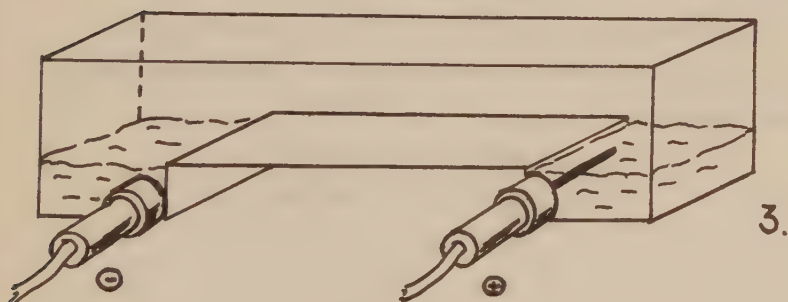
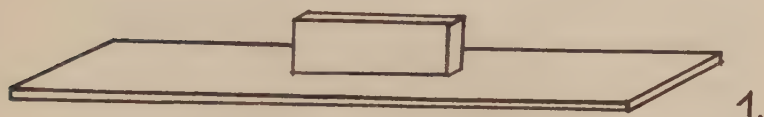
Mischungsverhältnis: 88 ml A + 12 ml B.

Nach etwa 2 Stunden wurde zur Anfärbung Echtblausalz RR (100 mg in 20 ml H_2O) oder Echtblausalz B (40 mg in 20 ml H_2O) zugegeben. Nach etwa 16 Stunden folgte die Auswertung.

4. Ergebnisse

Ausgewertet wurde so, daß der Abstand der Banden von der Startlinie aus und die Breite gemessen wurde. Auf Fehlerquellen und Abweichungen wird unten eingegangen.

Abb. 1
Elektrophoresekammer



1. Kammerdeckel
2. Gußbank mit Schwamm (links) und beimpftem Stärkeblock
3. Wanne mit Pufferflüssigkeit und Elektroden.

I. Mensch

Eine deutliche Bande bei 4,5 mm von 1-2 mm Stärke konnte bei allen Versuchen nachgewiesen werden. Nach 8-monatiger Aufbewahrung des Trockenblutes im Kühlschrank war keine Aktivitätsminderung feststellbar. Zitratblutflecken (80% Vollblut) auf Leinen ergaben noch bei Mengen bis zu 0,005 ml nach 4-monatiger freier Aufbewahrung im Raume deutlich ablesbare Ergebnisse.

II. Kaninchen

Bei allen Untersuchungen waren drei deutliche Banden nachweisbar:

- 1) bei 6 mm (3 mm stark)
- 2) bei 13 mm (3 mm stark)
- 3) bei 19 mm (5-8 mm stark)

III. Pferd

Bei allen Versuchen konnten drei deutliche Banden gefunden werden:

- 1) bei 4 mm (2 mm stark)
- 2) bei 12 mm (5 mm stark)
- 3) bei 19 mm (7 mm stark)

IV. Hund

Zwei Banden:

- 1) bei 4 mm (2mm stark)
- 2) bei 9 mm (4-5 mm stark)

Im Gegensatz zur ersten Bande war die zweite von schwächerer Intensität und konnte nach 4-monatiger freier Aufbewahrung im Raume nicht immer deutlich nachgewiesen werden (s. auch VI).

V. Katze

Drei Banden waren bei allen Untersuchungen deutlich erkennbar:

- 1) bei 4 mm (2 mm stark)
- 2) bei 14 mm (3 mm stark)
- 3) bei 20 mm (7 mm stark)

VI. Huhn

Zwei Banden:

- 1) bei 3,5 mm (2 mm stark)
- 2) bei 20 mm (3-4 mm stark)

Im Gegensatz zu der ersten Bande, die bei allen Untersuchungen deutlich erkennbar war, konnte die

zweite, schwächere Bande nach 4-monatiger Aufbewahrung im Raume nicht mehr nachgewiesen werden (s. auch IV).

VII. Ziege

Eine schwache, jedoch bei allen Untersuchungen nachweisbare Bande bei 22 mm (3 mm stark).

VIII. Hammel

Eine Bande bei 23,5 mm (3 mm stark). Intensität wie bei VII.

IX. Schwein

Bei allen Untersuchungen waren keine charakteristischen Banden zu erkennen. In etwa 10 % wurde eine schwache Anfärbbarkeit vom Startpunkt aus bis 5 mm gefunden.

X. Rind (Kuh, Kalb, Bulle)

In etwa 10 % der Untersuchungen wurde eine äußerst schwache gefärbte Bande bei 5 mm (1 mm stark) ermittelt.

Die angegebenen Meßwerte wurden aus 20-25 Untersuchungen pro Tierblut, dabei jeweils 2-3 gleiche Proben in einem Stärkeblock, in Abständen von 3-10 Tagen angesetzt, errechnet.

5. Fehlerquellen

Bei ungeeigneter Wahl der Stromstärke und Spannung tritt eine Erwärmung des Stärkegels besonders im Bereich der Anode auf. Dadurch werden die einzelnen Banden infolge einer schnelleren Wanderung weiter auseinandergezogen. So können zwei gleiche Blutproben verschiedene Ergebnisse aufweisen, wenn ihre Startpunkte verschieden weit von Anode oder Kathode entfernt liegen. Bei sehr starker Erwärmung des Stärkeblockes ist Denaturierung der Esterasen möglich.

Auf Fehler, die sich durch unterschiedliche Feuchtigkeit des Stärkeblockes und zu starke Tränkung der Papierstreifen mit Probeflüssigkeit einstellen können, wurde bereits oben hingewiesen.

Um exakte Ergebnisse bei der Differenzierung unbekannter Trockenblute zu erzielen, muß der Untersucher folgende Bedingungen einhalten:

a) Berücksichtigung der o. a. Fehlerquellen.

b) Jede Probe sollte mindestens zweimal in verschiedenen und ebensooft in gleichen Versuchen untersucht werden.

c) Es sollten nur Proben verglichen werden, deren Startpunkt im Gel gleichweit von Anode oder Kathode entfernt liegt.

d) Bekannte Blutproben müssen mituntersucht werden.

e) Ober- und Unterseite des halbierten Stärkeblockes sollten mit je einem der beiden Farbstoffe getrennt angefärbt werden.

f) Die Auswertung sollte immer nach gleicher Zeit geschehen.

C. Besprechung

Das Wissen von der Existenz quantitativ und qualitativ verschiedener Esterasen bei einer großen Anzahl von Säugetieren, Vögeln und Fischen zeigte den Weg, diese Tatsache zur Differenzierung unbekannter Blutproben heranzuziehen. Es sind sowohl essentielle Unterschiede der Esterasemengen in den einzelnen Tierblutarten bekannt, als auch Schwankungen, die durch Krankheiten und Nahrung hervorgerufen werden. So weisen normalerweise Wiederkäuer, Vögel und Fische einen nur geringen Blutgehalt an Cholinesterasen auf, während Pferde einen wesentlich höheren Serumspiegel haben (1, 7, 15). Krankheiten, besonders jene, die mit einer starken Veränderung der Blutzellzahl einhergehen, bewirken Unterschiede (11). Bei allergischen Krankheiten ist der Cholinesterasespiegel häufig vermindert, bei der Nephrose erhöht (3). Bei Menschen- und Kaninchenblut ist eine Abhängigkeit von der Ascorbinsäurezufuhr bekannt (8). Charakteristischer als die quantitativen Differenzen von Tier zu Tier sind jene Unterscheidungsmerkmale, die sich durch verschiedene Substratspezifität, Hemmbarkeit der Reaktionen und Wanderung bei der Elektrophorese auszeichnen und so einzelne Esterasetypen zu trennen gestatten. Die Möglichkeit, die Artzugehörigkeit von Bluten, besonders von trockene-

nen Blutspuren, auf diese Weise ermitteln zu können, muß in der gerichtlichen Medizin großes Interesse finden. Dazu bietet sich in idealer Weise die von SMITHIES beschriebene Elektrophorese im Stärkegel an, denn es ist hier möglich, in einem Untersuchungsgang mehrere bekannte und unbekannte Proben gleichzeitig in übersichtlicher Form zu untersuchen. In den eigenen Versuchen wurden in der Regel 25 Proben in einem Stärkeblock untersucht.

Die Ergebnisse der bisherigen Veröffentlichungen sind zum Teil wenig übereinstimmend. Mit dieser Arbeit sollte der Versuch gemacht werden, die Differenzen der Esterasen einzelner Tierblutarten in getrocknetem Zustande aufzuzeigen.

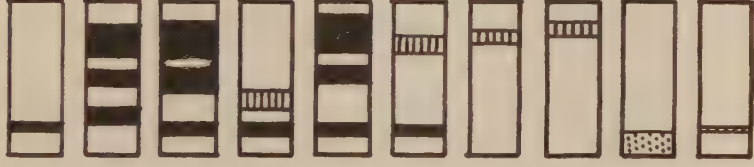
Im Folgenden sollen die eigenen Ergebnisse mit jenen früherer Veröffentlichungen verglichen werden. Es stehen dazu die Arbeiten von AUGUSTINSSON, LAWRENCE und Mitarbeitern und SAMICO und Mitarbeitern zur Verfügung. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse zeigt Abbildung 2. Farbige Abbildungen von Ergebnissen unserer Versuche sind bei SCHLEYER enthalten. In den ersten drei Spalten der Abb. 2 werden schematisch die ermittelten Banden von LAWRENCE und Mitarbeitern, SAMICO und Mitarbeitern und die eigenen Untersuchungen dargestellt. Die Lage und Breite der Banden ist durch die eingetragenen Linien gekennzeichnet. Starke Anfärbbarkeit ist dunkel, schwächere schraffiert und

Abb. 2

Erkl. s. Text

eigene
Ergebnisse

Vollblut



1. Mensch

2. Kaninchen

3. Pferd

4. Hund

5. Katze

6. Huhn

7. Ziege

8. Hammel

9. Schwein

10. Rind

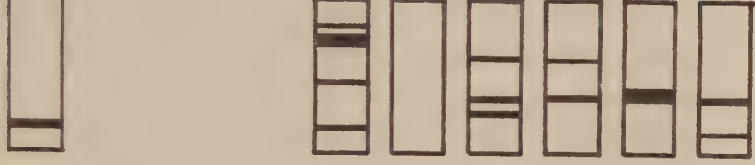
Lawrence

Serum



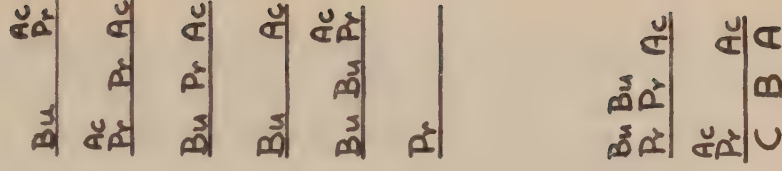
Samico

Vollblut



Augustinsson

Serum



schwächste gepunktet dargestellt, Wanderung der Proteine von links nach rechts, in der letzten Spalte zum Vergleich die drei Esterasearten A,B und C nach AUGUSTINSSON. Die Abkürzungen Ac = Acetat, Pr = Propionat und Bu = Butyrat sollen das jeweilige spezifische Substrat anzeigen. Die Ergebnisse von AUGUSTINSSON wurden jedoch im Gegensatz zu den beiden anderen Arbeiten nicht durch die Stärkegelelektrophorese gewonnen. Daher soll aus dieser Veröffentlichung nur die dort beschriebene Anzahl der gefundenen Esterasen, das bevorzugte Substrat und, soweit möglich, die Lagebeziehung zu den Proteinen zum Vergleich herangezogen werden. Ferner besteht insofern ein Unterschied, als AUGUSTINSSON und LAWRENCE Serum untersuchten, während die eigenen Ergebnisse und die von SAMICO durch Versuche mit Trockenblut entstanden.

1. Mensch

Übereinstimmend ergaben die eigenen Versuche und diejenigen von SAMICO eine einzelne Bande in geringem Abstände von der Startlinie. Dieser wenig wandernde Esterasetyp dürfte der von AUGUSTINSSON beschriebenen C-Esterase entsprechen, welcher als bevorzugtes Substrat Butyrat zugesprochen wird. Ferner beschreibt AUGUSTINSSON eine A-Esterase. Diese

soll sehr weit wandern und bei oder nahe den Albuminen liegen. Eine solche Esteraseart konnte aber weder von SAMICO oder LAWRENCE, noch in den eigenen Untersuchungen gefunden werden. LAWRENCE beschreibt drei Esterasetypen, deren Zuordnung nicht einfach erscheint. Auch kann ihre Lage, nach der Definition der A-, B- oder C-Esterasen durch AUGUSTINSSON, nicht genau erkannt werden. LAWRENCE wendet zum Vergleich der Esterasen mit den Serumproteinen die von SMITHIES angegebene Nomenklatur an, der zwei Fraktionen α_2 -Globulinen unterscheidet, welche bei der Elektrophorese vor und hinter den β -Globulinen liegen. Da sich nach AUGUSTINSSON die C-Esterasen zwischen den α_2 - und β -Globulinen befinden sollen, könnte es sich um eine solche handeln, jedoch in drei anderweitig nicht beschriebenen Fraktionen.

2. Kaninchen

In den eigenen Versuchen konnten jeweils drei deutliche Banden ermittelt werden. AUGUSTINSSON beschreibt ebenfalls drei Esterasetypen, deren A-Esterase noch in A_1 und A_2 unterteilt wird. Bei LAWRENCE werden zwei schwache Banden im Bereich der beiden α_2 -Globuline gezeigt und eine dritte, sehr intensive Bande im Bereich der Albumine. Die letzte Bande

Abb. 3

Eigene Untersuchungen

1 Mensch

2 Pferd



ist sicher mit der A-Esterase identisch, läßt jedoch die von AUGUSTINSSON genannte Aufteilung dieser Esterasegruppe vermissen. Ob die beiden schwachen Banden nur zu den C-Esterasen gehören oder den C- und B-Typ darstellen, kann nicht erkannt werden. Von SAMICO liegen keine Versuchsergebnisse mit Kaninchenblut vor.

3. Pferd

Von SAMICO und LAWRENCE wurden keine Ergebnisse von Untersuchungen an Pferdeblut beschrieben. Bei den eigenen Versuchen konnten drei deutliche Banden gefunden werden. Auch AUGUSTINSSON erwähnt drei Esterasetypen. Ein Vergleich der Lage zu den Serumproteinen ist nicht möglich, da diese in den eigenen Untersuchungen nicht festgelegt wurden.

4. Hund

AUGUSTINSSON fand Esterasen der Typen A und C. Die nur wenig wandernden C-Esterasen konnten in den eigenen Untersuchungen und in jenen von LAWRENCE ebenfalls ermittelt werden. Dagegen fehlen in beiden Fällen Ergebnisse über die A-Esterasen, welche weit, d. h. mit den Albuminen wandern sollten. In den eigenen Versuchen wurde ferner eine schwache Bande in

unmittelbarer Nähe der ersten gefunden. Die übrigen von LAWRENCE ermittelten vier Banden ließen sich in ihrer Lage zu den Serumproteinen nicht recht einordnen. Von SAMICO liegen keine Ergebnisse vor.

Die folgenden sechs Vergleiche müssen ohne Beziehung zu den Serumalbuminen und -globulinen vorgenommen werden, da LAWRENCE keine Ergebnisse an den unter 5. bis 10. genannten Tierblutarten angeführt hat.

5. Katze

AUGUSTINSSON beschreibt drei Esterasetypen. Eine gleiche Anzahl konnte auch in den eigenen Untersuchungen gefunden werden. SAMICO erwähnt dagegen vier. Es ist aber anzunehmen, daß es sich bei der letzten schmalen Bande um eine Teilfraktion der davorliegenden Bande handelt, da beide nur wenig voneinander getrennt liegen.

6. Huhn

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen stimmen weder mit denen von AUGUSTINSSON, noch mit denen von SAMICO überein. Dieser konnte keinerlei Banden nach-

weisen. AUGUSTINSSON beschreibt dagegen eine C-Esterase. Diese dürfte der in der eigenen Untersuchung gefundenen ersten, wenig wandernden Bande entsprechen. Die zweite Bande von geringer Intensität und Haltbarkeit wird jedoch anderweitig nicht beschrieben.

7. Ziege

Bei den eigenen Untersuchungen konnte nur eine einzelne Bande gefunden werden, die sowohl nach Lage und Intensität der des Hammelblutes sehr stark ähnelt. SAMICO beschreibt dagegen drei schwache Banden, von denen die beiden letzten mit denen des Schafblutes übereinstimmen. Von AUGUSTINSSON liegen von beiden Tierbluten keine Ergebnisse vor.

8. Hammel

Bei den eigenen Versuchen fand sich eine schwache Bande. SAMICO beschreibt zwei Banden (s.7.). Bei den Ergebnissen von Ziege und Schaf könnte jeweils die letzte Bande mit der bei den eigenen Untersuchungen gefundenen einzelnen Bande übereinstimmen. Jedoch bleiben bei der Ziege zwei und beim Hammel eine weitere Bande zusätzlich bestehen.

9. Schwein

AUGUSTINSSON beschreibt drei Esterasetypen, die jedoch weder in den eigenen Untersuchungen, noch in denen von SAMICO gefunden werden konnten. SAMICO erwähnt eine mittelstarke Bande, die ungefähr der B-Esterase entsprechen könnte. A- und B-Esterasen sollen nach den Angaben von AUGUSTINSSON gleichermaßen Butyrat hydrolysieren, SAMICO fand aber eine A-Esterase nicht. Eine C-Esterase fehlt ebenfalls. Bei den eigenen Untersuchungen ergab sich in etwa 10 % der Versuche eine Anfärbung, die vom Startpunkt aus langsam schwächer werdend sich allmählich verlor.

10. Rind

AUGUSTINSSON beschreibt A- und C-Esterasen. Der wenig wandernden C-Esterase dürfte die erste Bande bei den Ergebnissen von SAMICO und die einzige der eigenen Untersuchungen entsprechen. Die weitere Bande bei SAMICO kann nach ihrer Lage wohl nicht als A-Esterase angesehen werden, sondern entspräche eher einer B-Esterase, die aber AUGUSTINSSON nicht erwähnt.

Weiterhin soll noch Rattenblut erwähnt werden, das in den eigenen Versuchen nicht untersucht wurde.

AUGUSTINSSON gibt drei Esterasetypen an, ebenso LAWRENCE. Bei SAMICO werden dagegen vier verschiedene Banden beschrieben.

Die von AUGUSTINSSON genannte Zahl von höchstens drei verschiedenen Esterasen in einem Tierblut - er erwähnt Untergruppen bei Kaninchen (A_1 und A_2) und bei Meerschweinchen (B_1 und B_2) - wird bei SAMICO und LAWRENCE in einigen Fällen überschritten. So wies SAMICO vier Banden bei Ratte, Katze und Truthahn nach, während LAWRENCE vier Banden bei Hund und Maus gefunden hat. Auffällig erscheinen auch die Unterschiede in der von AUGUSTINSSON angegebenen Substratspezifität der einzelnen Esterasetypen. Eine besondere Spezifität kann nur bei kurzer Einwirkungsdauer sicher erkannt werden, während bei längerer Lauer auch andere Substrate, obwohl langsamer hydrolysiert werden. Die zum Vergleich vorliegenden Veröffentlichungen enthalten jedoch keine Angaben über die Zeitspanne von der Zugabe des Substrates bis zur Auswertung.

D. Zusammenfassung

Einleitend wird der Stand der Kenntnisse über die Esterasen in Tier- und Menschenblut referiert. Sodann wurden zahlreiche Trockenblutproben der Species: Mensch, Kaninchen, Pferd, Hund, Katze, Huhn, Ziege, Hammel, Schwein und Rind in der Stärkegelelektrophorese untersucht. Die Angaben der Literatur über die Differenzierungsmöglichkeiten an Hand des Bandenmusters wurden zum Teil bestätigt, zum Teil wurden abweichende Befunde erhoben. Eine Differenzierungsmöglichkeit für Menschenblut ergab sich bis zu einem Trockenblutalter von 8 Monaten. Insgesamt wurden 690 Einzelversuche gemacht. Die Technik und die Fehlerquellen der Untersuchung wurden ausführlich beschrieben. Die Methode eignet sich zur Unterscheidung von Menschen- und Tierblut in Trockenblutspuren. Bei angetrockneten Blutflecken wurden als unterste Nachweisgrenze 0,005 ml ermittelt.

E. Literatur

1. ABDERHALDEN, R.: Vitamine, Hormone und Fermente
⁴Basel (Schwabe) 1953
2. ALDRIDGE, W.: Serum Esterases, J. Biochem. 53.
110, 1953
3. AMMON, R. und W. DIRSCHERL: Fermente, Hormone,
Vitamine, ³Stuttgart (Thieme) 1959
4. AMMON, R. und M. JAARMA, zit. nach SUMNER und
MYRBÄCK
5. AUGUSTINSSON, K.: Electrophoretic Separation and
Classification of Blood Plasma Esterases
Nature 181, 1786, 1958
6. AUGUSTINSSON, K.: Acta chem. Scand. 13, 571, 1959
zit. nach GOEDDE und FUSS
7. BAMANN, E. und K. MYRBÄCK (Hrgb.): Die Methode
der Fermentforschung, Leipzig (Thieme) 1941
8. BERSIN, T.: Kurzes Lehrbuch der Enzymologie
⁴Leipzig (Geest & Portig) 1954
9. GOEDDE, H. und W. FUSS: Untersuchungen zur Phylo-
genetik der Pseudocholinesterasen. Human-
genetik 1, 126, 1964
10. GUNTER: Nature 157, 369, 1946, zit. nach AMMON
und DIRSCHERL
11. HARDIN, E., W. VALENTINE, J. POLLETTE and J. LAWRENCE
Esterase and Lipase Activity of leucocytes

- and Erythrocytes in Health and Disease.
Am. J. med. Sci. 229, 397, 1955
12. HARRIS, H., D. HOPKINSON and E. ROBSON: Two-Dimensional Electrophoresis of Pseudo-cholinesterase Components in Normal Human Serum. Nature 196, 1296, 1962
13. HOFFMANN-OSTENHOF, O.: Enzymologie, Wien (Springer) 1954
14. LAWRENCE, S., P. MELNICK and H. WEIMER: A Species Comparison of Serum Proteins and Enzymes by Starch Gel Electrophoresis. Proceed. Soc. exp. Biol. Med. 105, 572, 1960
15. MYERS, D.: Studies on Cholinesterase. J. Biochem. 55, 67, 1953
16. POULIK, M. and O. SMITHIES: J. Biochem. 68, 636, 1958, zit. nach HARRIS und Mitarb.
17. SAMICO, A., H. CONTINHO, J. ROCHA and R. HUNTER: The Zymogram Method as a Tool for the Characterization of Unknown Blood After It Has Dried. J. for. Sci. 7, 480, 1962
18. SCHLEYER, F.: Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspurenuntersuchung, Lübeck (Schmidt-Römhild) 1966
19. SMITHIES, O.: Zone Electrophoresis in Starch Gels. J. Biochem. 61, 629, 1955

20. SUMNER, J. and K. MYRBÄCK (Ed.): The Enzymes,
New York (Academic Press) 1950
21. WHITTAKER, V.: Physiol. Rev. 31, 312, 1951, zit.
nach ALDRIDGE
22. ZAJÍČEK und DASSA: Acta Haematol. 9, 115, 1953
zit. nach AMMON und DIRSCHERL.

Herrn Professor Dr. med. F. Schleyer danke ich
für die Arbeitsmöglichkeit am Institut für Gericht-
liche Medizin der Universität Marburg und für die
Überlassung des Themas, seine Beratung bei den
Versuchen und bei der Abfassung der Dissertation.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten:

in Gießen:

Ankel, v. Denffer, Hanle, Kröhnke, Rollhäuser,
Scharmann, Schuchardt, Staudinger, Thauer

in Mainz:

Boneff, Brandt, Bredt, Dabelow, Haas, Herzau,
Kuschinsky, Lang, Leicher, Oppel, Overzier,
Schriever, Voit, Watzka

in Marburg:

Braun-Falco, Dölle, Exner, Gedigk, Hamm, Hartmann
Heuser, Hildebrandt, Jakob, Lang, Linneweh, Mann,
Marx, du Mesnil de Rochemont, Rodeck, Rohen, Sauer,
Schleyer, Schmid, Schölmerich, Schwaiger, Siegert,
Siess, Streicher, Würterle.

Lebenslauf

Am 18. Februar 1939 wurde ich als erstes Kind der Eheleute Otto Raabe, Pfarrer, und Käthe Raabe, geb. Ziegs, in Gießen geboren.

Meine Kindheit verlebte ich in Ober-Widdersheim. Dort besuchte ich auch die Grundschule. Von 1950 bis 1959 war ich Schüler des Gymnasiums in Nidda, wo ich am 25. 2. 1959 die Reifeprüfung bestand.

Im gleichen Jahre begann ich in Gießen mit dem Studium der Medizin und legte dort im Frühjahr 1960 das Vorphysikum ab. Vom Sommersemester 1961 an studierte ich in Mainz und bestand dort im April 1962 das Physikum. Im Mai 1963 setzte ich mein Studium in Marburg fort. Dort beendete ich am 11. 2. 1966 mit dem Staatsexamen mein Studium.

Am 1. 4. 1966 begann ich meine Medizinalassistentenzeit im Kreiskrankenhaus zu Osterholz-Scharmbeck.

